

DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Debrecen (Igazgató: Prof. Dr. Sziklai István)

¹DE OEC, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen (Igazgató: Doc. Dr. Kónya József)

Az otosclerosisra jellemző CD46 variánsok molekuláris biológiai jellemzése

Csomor Péter dr., Szalmás Anita¹dr., Kónya József¹ dr., Karosi Tamás dr., Sziklai István dr.

ÖSSZEFOGLALÁS: Az otosclerosis az emberi oticus capsula elsődleges csontátépülési zavara, melynek létrejöttében szerepet játszhat az oticus capsulát érintő perzisztáló kanyaróvírus fertőzés. A kanyaróvírus emberi sejtreceptora a membrán kofaktor fehérje (MCP, CD46), amely 14 ismert „splicing” variánssal rendelkezik. Az oticus capsula és a stapes talp egyedi CD46 kifejeződési mintázata meghatározhatja a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés, illetve replikáció iránti fogékonyságot. Ötvenegy stapedectomy során eltávolított stapes talpat vizsgáltunk kórszövettani- és molekuláris biológiai módszerekkel párhuzamosan. A nukleinsavakat (mRNS, DNS, vRNS) kivontuk a stapes talpából. A kanyaróvírust nukleoprotein RNS specifikus RT-PCR-rel azonosítottuk. Az alternatív „splicing” során keletkező CD46 izoformákat RT-PCR segítségével sokszoroztunk. A komplementer DNS (cDNS) amplimereket SDS polyacryl-amid gélelektroforézissel választottuk külön, majd a gélekből sorozatos tisztítással kivontuk. A tisztított cDNS mintákat CD46 specifikus hasítási helyekkel rendelkező restrikciós endonukleázokkal többszörösen hasítottuk. A kanyaróvírus eredetű RNS-t csak a szövettanilag megerősített otosclerosisos stapes talpokban mutattuk ki; a kanyaróvírust nem tartalmazó stapes talp szövettanilag nem-otosclerosisos stapes ankylosisnak bizonyultak. A szövettani vizsgálat eredményétől függetlenül, minden mintát (N=51) öt CD46 variáns együttes expressziója jellemzett (c, d, e, f, és egy rövidebb ismeretlen izoforma). A szövettanilag otosclerosisosnak véleményezett mintákat (N=21) az f variáns és az ismeretlen rövid variáns kifejezetten emelkedett expressziója jellemezte. A fenti két CD46 izoforma fokozott kifejeződése és az oticus capsula egyedi CD46 expressziós mintázata megváltozott, illetve kóros intracelluláris jelátvitelt eredményezhet a kanyaróvírus receptorok szintjén. Ezek a változások a következményes immunológiai eltérésekkel együtt, magyarázhatják a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés oticus capsulán belüli kialakulását.

KULCSSZAVAK: CD46, kanyaróvírus, otosclerosis, restrikciós elemzés, RT-PCR

SUMMARY: Otosclerosis is a primary bone remodeling disorder of the human otic capsule and is associated with persistent measles virus infection. The human cellular receptor of measles virus is the membrane cofactor protein (MCP, CD46), which has fourteen well-described splicing variants. Unique CD46 expression pattern of the otic capsule and the stapes footplate may determine the susceptibility for persistent measles virus infection. Fifty-one surgically removed ankylotic stapes footplates were analyzed by histopathological and molecular biological methods, respectively. Nucleic acids were extracted. Measles virus sequences were detected by nucleoprotein RNA-specific RT-PCR. Alternatively spliced RNA of CD46 isoforms were amplified by RT-PCR; cDNA amplimers were separated by SDS poly-acrylamide gel electrophoresis and were purified from the gel. Complementary DNA of CD46 isoforms was restricted by endonuclease enzymes having CD46-specific recognition sites. The presence of viral RNA was obligatory associated with the histopathological diagnosis of otosclerosis; measles virus negative stapes specimens belonged to non-otosclerotic stapes fixations. All specimens (N=51) were featured by the consequent expression of five CD46 variants (c, d, e, f, and one shorter unidentified isoform). Histologically confirmed otosclerotic specimens (N=21) were characterized by increased expression levels of variant f and the unknown isoform. Increased expression levels of these isoforms and special CD46 expression pattern of the human otic capsule might produce modified or pathological intracellular signalization that could create the possibility of persistent measles virus infection.

KEYWORDS: CD46, measles virus, otosclerosis, restriction analysis, RT-PCR

Bevezetés

Az otosclerosis halláscsökkenéssel járó megbetegedés, melyet az oticus capsula és a stapes talp kórosan felfokozott csontátépülése okoz (1). A patológiás csontremodellizációs folyamat az otosclerosisos gócon belül fokozott osteoclast tevékenységgel és intenzív osteolysissal jellemezhető (2). Az otosclerosi-

Közlésre érkezett: 2009.08.13.

DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika

Cím: 4032 Debrecen, Nagyterdei krt. 98.

Tel./Fax.: + (36-52) 414-763

E-mail: karositamas@gmail.com

Web: www.earpathology.eu

sos góccok kizárólag az oticus capsulán belül keletkeznek: a stapes talpban, a pericochleáris valamint a perilabyrinthae régiókban (3). Mivel az otosclerosis által érintett és átépült stapes talp fizikai és mechanikai tulajdonságai megváltoznak, elsődlegesen vezetékes halláscsökkenés alakul ki (1). A kaukázusi fehérek között a klinikai otosclerosis (valójában ismeretlen eredetű stapes fixáció) prevalenciája általánosan 0,3–0,4%-ra tehető, míg a vezetékes halláscsökkenésben szenvedők között eléri a 9–12%-ot is (1).

Korábbi tudományos eredmények alapján, az otosclerosis fő kóroki tényezője az emberi oticus capsula perzisztáló kanyaróvírus fertőzése lehet (4–9). A kanyaróvírus eredetű antigének folyamatos jelenléte feltehetőleg serkenti a lokális celluláris immunválaszt, amely következményes gyulladásos csontátépülést, és ezzel párhuzamosan kialakuló szenzorineurális halláscsökkenést eredményez (1, 8, 10). Korábbi tanulmányok részletesen elemezték a kanyaróvírus otosclerosisban betöltött rendhagyó patogén szerepét, és szignifikáns összefüggést találtak (5, 8). Az otosclerosis stapes talpakban több kutatócsoport is azonosította a kanyaróvírus genomot RT-PCR technika segítségével (4, 6). A paramyxovírus-szerű részecskéket elektronmikroszkópia során is kimutatták az otosclerosis góccok osteoclastjaiban és osteoblastjaiban is (9).

A kanyaróvírus lévén a Paramyxovírus család (*Gens Paramyxoviridae*) tagja, három, a víruscsaládra jellemző útvonalon képes bejutni az emberi sejtekbe (11, 12). A legfontosabb és legnagyobb hatásfokkal bíró fertőzési útvonal a SLAM (Signalling Lymphocyte Activating Protein, CD150) receptorokhoz kötött; a CD46 receptoron (MCP, Membrane Cofactor Protein) keresztül bekövetkező fertőzés kisebb hatásfokkal bír ugyan, de minden emberi sejt fertőzésére alkalmas, tehát általánosan elterjedt (11, 12). A vírusfertőzés újabb útjait is feltárták olyan sejtvonalakon, melyek nem fejeztek ki egyetlen eddig ismert kanyaróvírus receptort sem (11). Ezek az infekciós utak igen kis hatásfokúak, nem járnak jelentős vírusreplikációval és szinte azonnali sejtszéteséshez vezetnek (11). Az eddig még ismeretlen kanyaróvírus receptor-szerű molekulát Receptor X-nek nevezték el (11).

Immunhisztokémiai tanulmányok szerint a SLAM-típusú fehérjék nagyon alacsony expressziós szintet mutatnak az emberi oticus capsulában, szemben a CD46-típusú kanyaróvírus receptorral, amely nagy mennyiségben fejeződik ki (13, 14). Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a kanyaróvírus bejutása az oticus capsula sejtjeibe alapvetően a CD46 receptoron keresztül valósul meg (13).

A CD46 fehérje 14 ismert variánssal (izoformával) rendelkezik, amelyek az egyetlen CD46 génről átíródott mRNS alternatív „splicing”-ja során változó mennyiségben és mintázatban fejeződnek ki (14).

Alternatív „splicing”: a DNS-ről átíródott mRNS rendhagyó poszttranszlációs módosulása, melyet az elmúlt 20 évben fedeztek fel. A folyamat lényege, hogy egy adott génről átíródott mRNS számos fehérjét kódolhat, melyek keletkezése egyidőben is történhet. Az alternatív „splicing” úgynevezett splicoszómákban megy végbe, melyek az endoplasmaticus reticulumokon kívül helyezkednek el. Ez a folyamat csak néhány gént érint, szabályozása ismeretlen. Felfedezésével megrendült az „egy gén egy fehérje” többévtizedes, megdönthetetlennek vélt dogmája (a szerzők megjegyzése).

A CD46 génje az 1. kromoszómán helyezkedik el, és 14 olyan exonból áll, amelyek meghatározzák a molekula egyes funkcionális alegységeinek szerkezetét (14, 15). Az első hat exon kódolja a CD46 molekula konzervatív régióját, benne a CCP (Complement Control Protein) és az SCR (Short Consensus Repeat) alegységeket, amelyek a szérum faktor I-el együttesen aktiválódva felelősek a C3b és a C4b komplement faktorok proteolitikus inaktivációjáért (15, 16). A CCP régió egyben a kanyaróvírus alreceptora is (11, 12). A 7-9-es exonok kódolják az úgynevezett STP (Serine Threonine Proline Rich) régiót, amely a CD46 molekula extracelluláris mátrixhoz való kötődésében játszik szerepet (17). A 10-12-es exonok kódolják a CD46 molekula transzmembrán doménjét (15–17). Az elmúlt évben négy, kizárólag otosclerosis stapes talpakban előforduló (otosclerosis-specifikus) CD46 „splicing” variánst írtak le (18). Ezek közül egyet a transzmembrán domén teljes hiánya jellemez, amely szolubilis, cytoplazmatikus formát sejtet (18). A 13-as és a 14-es exon kódolja a CD46 cytoplazmatikus doménjét, amely az intracelluláris, foszforiláz-függő jelátvitelben játszik fontos szerepet (19). A különböző CD46 izoformák négy eltérő cytoplazmatikus doménnel rendelkezhetnek, melyek egyenként is sajátos és igen változatos jelátviteli útvonalakat aktiválnak. Ezek sorrendben: a gyakori CYT-1 (17 aminosav), és a CYT-2 (24 aminosav), valamint a ritkán előforduló CYT-3 és a CYT-4 (19). Az emberi immunsejtek CD46 receptorokon keresztül bekövetkező kanyaróvírus fertőzése hosszantartó és mélyreható változásokat okoz a különböző gyulladásos citokinek (interleukin-1, -6, -12) expressziójában, amely egyben fontos a szerepet is játszik a T-helper 1 (Th1) és a T-helper 2 (Th2) sejtek érésében és differenciálódásában (20–24). A különböző CD46 izoformák minden sejtmaggal rendel-

kező emberi sejt felszínén kifejeződnek, de expressziós szintjük és mintázatuk inter- és intraindividuálisan is, valamint a szövettípustól függően is jelentősen különbözhet (14). Ennek ellenére a fent említett otosclerosis-specifikus CD46 variánsok leírása előtti években nem találtak összefüggést a szöveti CD46 izoforma mintázat és egyes betegségek, állapotok vagy fenotípusok között (14, 17).

Tanulmányunkban restrikciós endonukleázok segítségével elemeztük a CD46 „splicing” variánsok expressziós mintázatát otosclerosisos- és nem-otosclerosisos stapes talpakban. Eredményeinket a kórszövettani vizsgálatok- és a kanyaróvírus specifikus RT-PCR leleteivel párhuzamosan értékeltük.

Anyagok és módszerek

Betegek és kontroll minták

Ötvenegy, stapedectomy során eltávolított, ankyloticus stapes talpat vizsgáltunk (N=51, férfiak=17, nők=34). Az eltávolítást követően a mintákat 10%-os, pufferelt formalinban fixáltuk. A következő fejezetben leírt módon posztoperatív kórszövettani vizsgálatot végeztünk annak érdekében, hogy elkülöníthessük az otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes fixációkat. A nem-otosclerosisos stapes fixációk esetén a betegek átlagéletkora 35,47 év (N=30; tartomány=19–57 év); otosclerosisos esetén az átlagéletkor 39,17 év volt (N=21; tartomány=23–62 év). A stapes fixáció klinikai diagnózisát az otoscopy-, az audiológiai- és a tympanometriás leletekre alapoztuk. Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-lég köz legalább 30 dB volt. Az esetek többségében (>90%) a tympanometriás vizsgálat As-típusú tympanogramot eredményezett. Egy beteg sem emlékezett gyermekkori kanyaróvírus fertőzésre, azonban 17 beteg (mindannyian 1969 után születtek) részesült dokumentált, monovalens kanyaróvírus-ellenes védőoltásban. A kanyaróvírus-ellenes IgG szérumszinteket ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) technikával mértük a gyártó, klinikai mintákra vonatkozó utasításainak megfelelően (Immuno Biological Laboratories, IBL, Németország). A kanyaróvírus-ellenes IgG szérumszintet 12 IU/ml felett pozitívnak (szerokonverzió védőoltás vagy átvészelt fertőzés miatt) értékeltük. A szürke (bizonytalan) zóna a 8–12 IU/ml érték közé esett, míg a biztosan negatív reakció (ez jellemző az otosclerosisra) a 8 IU/ml koncentráció alatt volt. A 30, szövettanilag elkülönített, nem-otosclerosisos stapes mintát az otosclerosisos mintákkal szemben negatív kontrollként használtuk. A Magyar Tudományos Kutatási Bizottság ETT-TUKEB/2008-113-547/89 nyilvántartási számon elfogadta és engedélyezte tanulmányunkat.

Kórszövettani vizsgálat

Az ötvenegy ankyloticus stapes talp mintát 10%-os pufferelt formalinban fixáltuk, majd 0,5 M-os Na-EDTA-oldatban dekalcináltuk (nátrium etilén-diamino-tetraacetát, 72 óra, 4 °C). Az így előkészített mintákat 20%-os analitikai tisztaságú zselatinba ágyasztuk (24 óra, 56 °C), majd 4%-os paraformaldehid-oldatban újrafixáltuk (24 óra, 20 °C). Az így elkészített és szikével téglatest formájúra vágott blokkokat krioprotekció céljából 20%-os szacharóz-oldatba helyeztük (2 óra, 4 °C), majd egy kriomikrotómmal (Slee, Németország) 10 µm vastagságú szeletekre vágtuk (–45 °C). A szövettani metszeteket 0,1 M-os PBS-ben tároltuk (phosphate buffered saline és nátrium-azid, 4 °C). A fagyasztott metszetsorozatokot két részre osztottuk és párhuzamosan vizsgáltuk a következők szerint: 1. Nukleinsav kivonás és RT-PCR amplifikáció; 2. Hematoxylin-eozin festés. A szövettani metszeteket normális és polarizált fény alkalmazásával fényképeztük le, a fájlokat jpeg formátumban, elektronikusan tároltuk (Axioskop2 MOT, Axiovision 3.0, Zeiss, Jena, Németország).

Nukleinsav extrakció és a kanyaróvírus genom kimutatása (RT-PCR)

A homogenizált szövettani metszetek teljes RNS tartalmát kivontuk az úgynevezett TRI Reagent-oldat alkalmazásával. Az RNS izolálást illetően mindenben a gyártó klinikai mintákra vonatkozó utasításainak megfelelően jártunk el (Sigma-Aldrich, Egyesült Államok). A kanyaróvírus genom jelenlétét „semi-nested” reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) mutattuk ki, a primerek által felismert célszekvencia a kanyaróvírus genom 1091.–1531. nukleotidjai (5'–3') között helyezkedett el. A kanyaróvírus nukleoprotein (NP) RNS-ét egy NP-specifikus primer kombinációval amplifikáltuk: MV2-MV3 (1. táblázat). A reakció RT-lépésében az rTth enzimet (Recombinant Thermus thermophilus; Applied Biosystems, Egyesült Államok) alkalmaztuk. Az RT-lépésben keletkezett cDNS-t (Complementary DNA) a „semi-nested” PCR során genomikus Red-Taq DNS-polimerázzal (Sigma-Aldrich, Egyesült Államok) amplifikáltuk. Ebben a reakcióban egy speciális primer kombinációt alkalmaztunk: MV3 és MV4; MV2 és NP14 (1. táblázat). A kanyaróvírus kimutatásért felelős RT-PCR reakció sikerességét és validitását egy úgynevezett háztartási génekre specifikus kontroll primer kombinációval ellenőriztük: h36B4+ és h36B4- (1. táblázat). Az emberi celluláris kontroll RT-PCR reakció során „Enhanced Avian” reverz transzkriptáz (EA-RT; Sigma-Aldrich, Egyesült Államok) és genomikus Red-Taq DNS polimeráz

A kanyaróvírus és a CD46 specifikus oligonukleotid primerek (próbák) fő jellemzői

Primer (próba)	Szekvencia (5'- 3')	Kötődési hőmérséklet
Kanyaróvírus nukleoprotein (NP) specifikus primerek		
RT* primerek	MV2 (-) GTTCTTCCGAGATTCCTGCCA	62 °C
MV3 (+)	GCATCTGAACTCGGTATCAC	62 °C
Seminested** primerek		
MV4 (-)	AGCTCTCGCATCTGCTCT	55 °C
NP14 (+)	GCAAGGAAGATAGGAGGGTC	55 °C
Emberi celluláris kontroll primerek		
H36B4+ (+)	AGATGCAGCAGATCCGCAT	55 °C
H36B4- (-)	ATATGAGGCAGGAGTTTCTCCAG	55 °C
CD46 specifikus primerek		
<i>RT primerek</i>		
CD46Kfor (+)	GAGTGTAAGTGGTCAAATGTCG	75 °C
CD46Krev (-)	GGAGTGGTTGATTAGTCTGGTAA	75 °C
<i>cDNS***-PCR primerek</i>		
CD46Bfor (+)	TCGATGGCAGCGACACAA	60 °C
CD46Brev (-)	GGTAAGTGGCATATTCAGCTCCA	60 °C

* RT: Reverz transzkripció

** Seminested: speciális reverz transzkripció módszer, ahol a PCR (polimeráz láncreakció) második köre az első kör primereit részben tartalmazza

*** cDNS: komplementer DNS – a reverz transzkripció során az RNS-ből átvírt DNS termék

(Sigma-Aldrich, Egyesült Államok) enzimet használtunk. Pozitív kontrollként élő attenuált, Edmonston-típusú kanyaróvírus törzset alkalmaztunk. A kereszt-kontaminációk elkerülése végett minden PCR reakcióban RNS-mentes mintákat is beállítottunk (4).

A CD46 „splicing” variánsok kimutatása (RT-PCR)

A CD46 eredetű RNS-t két CD46 RNS specifikus primer segítségével sokszorozítottuk: CD46Kfor és CD46Krev (1. táblázat). A CD46 génről átíródott RNS hypervariábilis régióját övező szekvenciákat az RT-lépésben „enhanced avian myeloblastosis virus” reverz transzkriptáz enzim (eAMV-RT; Sigma-Aldrich, Egyesült Államok) segítségével amplifikáltuk. A befogott szekvenciák a konzervatív régióban helyezkedtek el, lehetővé téve a változó méretű és változatos átíródású, valamint az alternatív „splicing”-on átessett RNS szekvenciák konzekvens sokszorozását. A CD46Kfor elnevezésű primer az 5. és 6. exon határán rendelkezik specifikus kötődési (annealációs) hellyel, míg a CD46Krev elnevezésű primer a 14. exont célozza. A primereket a szerzők tervezték, a PubMed adatbázis „blast” programjának futtatása révén kizárólag az emberi CD46 mRNS-re specifikusak, felhasználásuk a szerzők engedélyével lehetséges. Az így felsokszorozított cDNS szekvenciák az érett CD46 mRNS teljes hypervariábilis régióját tar-

talmazták. A cDNS PCR során úgynevezett „JumpStart Accu Taq LA” DNS polimeráz enzimet (Sigma-Aldrich, Egyesült Államok) alkalmaztunk két „seminested” primer kombinációval: CD46Bfor és CD46Brev (1. táblázat). DNS-mentes desztillált vizet alkalmaztunk negatív kontrollként. Az RT-PCR reakciók során a következő hőmérsékleti- és időparamétereket alkalmaztuk; RT-lépés: a primereket és a mintákat 75 °C-on 10 percen keresztül inkubáltuk, a „master mix”-et az így előkészített mintákhoz adtuk, majd 48 °C-os hőmérsékleten 20 perces inkubáció következett, ezt egy 30 perces 50 °C-on véghezvitt újabb inkubáció követte. cDNS-PCR: a kétszálú cDNS mintákat 94 °C-os hőmérsékleten 3 percen keresztül denaturáltuk, egyszálúvá tettük. Az anealáció és az extenzió 60 °C-os és 68 °C-os hőmérsékleten ment végbe, összesen 35 cikluson keresztül, amelyet egy 2 perces, 68 °C-os hőmérsékleten véghezvitt, végső inkubáció követett. A hőmérsékleti- és ciklusprofil kidolgozása Sz.A. munkája. A CD46 specifikus RT-PCR során keletkezett amplimereket agaróz gélelektroforézissel különítettük el. A különböző CD46 izoformák relatív expressziós szintjeit denzitometria segítségével állapítottuk meg (18).

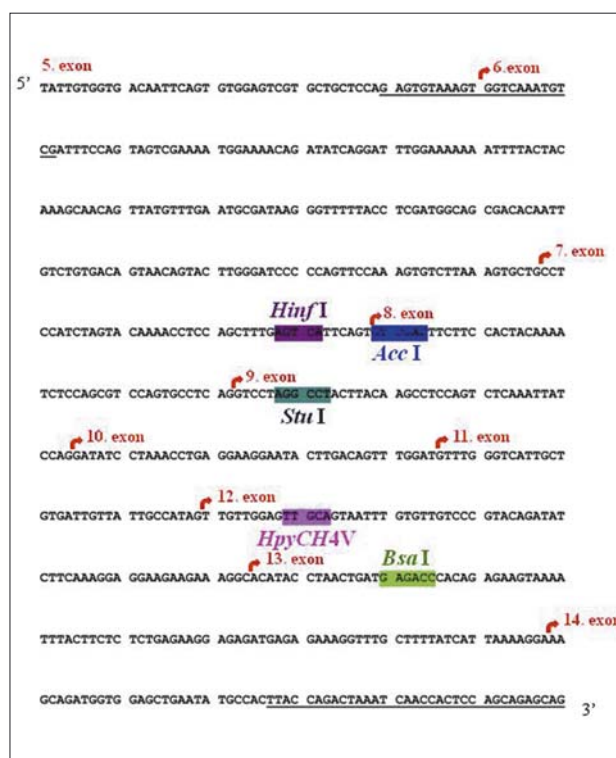
A CD46 amplimerek polyakrilamid gélből történő tisztítása

A cDNS-PCR során keletkezett CD46 specifikus

amplimereket végül nem-denaturáló SDS poli-akrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk. A géleket etidium-bromiddal festettük. Tekintettel arra, hogy számos CD46 „splicing” variáns igen hasonló molekulatömeggel rendelkezik, pusztán a molekulatömeg alapján nem elkülöníthetőek. A géleket ezért UV fénnel világítottuk meg és az egyes CD46 variánsokat reprezentáló, fluoreszkáló csíkokat mikroszkóp alatt steril, egyszer használatos szikével kivágtuk. Az így kinyert gélblokkokat *Eppendorf* mikrocentrifuga csövekbe (1,5 ml) helyeztük, majd a mintákhoz 300 ml elúciós puffert (0,5 M ammónium-acetát, 1 mM EDTA) adtunk, amelyeket egy éjszakán át 37 °C-os hőmérsékleten inkubáltunk. A géldarabkák felülszóját centrifugálás segítségével különítettük el. A minták DNS tartalmát kétszeres térfogatú, 100%-os etanollal csaptuk ki (–70 °C, 10 perc); a DNS pelyhet 70%-os etanolban oldottuk fel, majd szárítottuk és 20 ml TE pufferben (Tris-borát EDTA) újrassuszpendáltuk.

Az elkülönített CD46 variánsok restrikciós hasítással történő azonosítása

Az elkülönített CD46 „splicing” izoformákat restrikciós hasítással azonosítottuk. A restrikciós reakciók során kizárólag olyan DNáz enzimeket alkalmaztunk, amelyek a CD46 gén hipervariábilis régiójában rendelkeztek specifikus felismerő és hasító hellyel. A restrikciós elemzésre a következő enzimeket találtuk alkalmasnak: 1. *Hinf*I (7. exon); 2. *Acc*I (8. exon); 3. *Stu*I (9. exon); 4. *HpyCH4V* (12. exon); 5. *Bsa*I (13. exon) (1. ábra, 2. táblázat). Az összes cDNS mintát mind az öt fent említett restrikciós enzim eleggyel emésztettük (48 °C, 24 óra). A



1. ábra. A CD46 molekula hipervariábilis régióját kódoló mRNA (messenger RNS) nukleotid szekvenciája és az erre specifikus restrikciós endonukleázok felismerési- és hasítási helyei.

Az aláhúzott szekvencia elemek a CD46 specifikus RT-primerek kapcsolódási-, annealációs helyeit jelölik (CD46Kfor és CD46Krev).

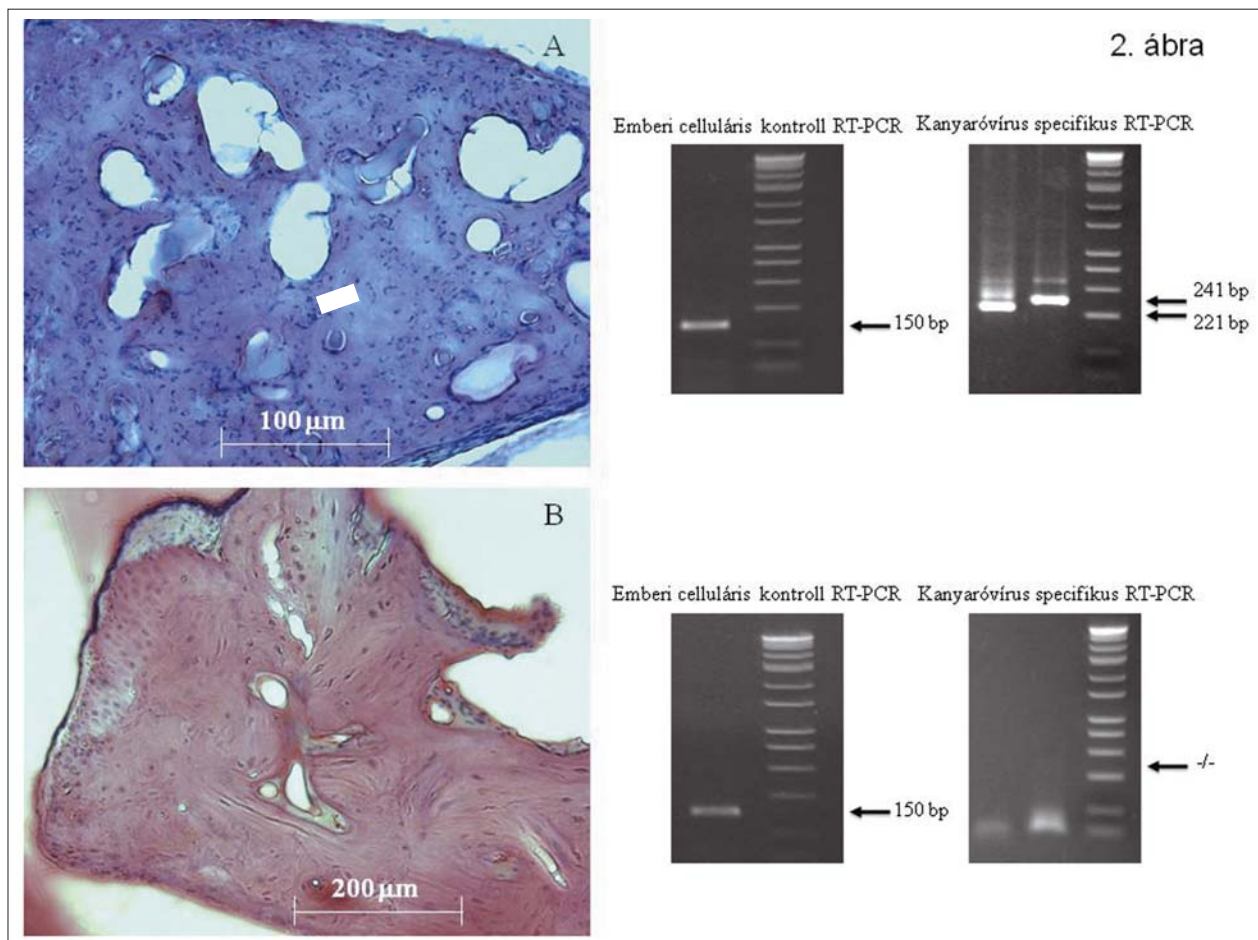
A piros hajlított nyilak az mRNA részlet egyes exonjainak induló szekvenciáit jelölik.

A színes négyyszögek a restrikciós endonukleázok specifikus hasítási helyeit mutatják. A CD46 mRNA-nak hipervariábilis régiójára a *Hinf*I, *Acc*I, *Stu*I, *HpyCH4V* és a *Bsa*I restrikciós endonukleáz enzimek rendelkeznek specifikus hasítási helyekkel

2. táblázat

A különböző CD46 variánsok hipervariábilis régióira specifikus hasítási hellyel rendelkező endonukleázok tulajdonságai.

CD46 izoformák	A nested RT-PCR során keletkező termékméret	Restrikciós enzimek
n	227bp	<i>Stu</i> I
l	249bp	<i>HpyCH4V</i>
f	291bp	<i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i>
j	294bp	<i>Acc</i> I, <i>HpyCH4V</i>
m	299bp	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i>
d	336bp	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i>
h	336bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>HpyCH4V</i>
k	342bp	<i>HpyCH4V</i> , <i>Bsa</i> I
b	378bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i>
e	384bp	<i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i> , <i>Bsa</i> I
i	387bp	<i>Acc</i> I, <i>HpyCH4V</i> , <i>Bsa</i> I
c	429bp	<i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i> , <i>Bsa</i> I
g	429bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>HpyCH4V</i> , <i>Bsa</i> I
a	471bp	<i>Hinf</i> I, <i>Acc</i> I, <i>Stu</i> I, <i>HpyCH4V</i> , <i>Bsa</i> I



2. ábra. A kanyaróvírus nukleoprotein (NP) specifikus RT-PCR és az emberi celluláris kontroll RT-PCR eredményei az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes talpak kórszövettani leleteivel összefüggésben (H.E.).

A: A stapes talp elülső pólusában elhelyezkedő aktív otosclerosis góc. Az otosclerosis gócot hypercellularitás, tágas pseudovascularis ürök és erős basophilia jellemzi. Az emberi celluláris kontroll RT-PCR pozitív eredményt adott. A kanyaróvírus eredetű RNS mindkét seminested primer pár (MV3-MV4, MV2-NP14) segítségével kimutatható volt.

B: Annuláris, stepediovestibuláris kalkifikáció csökkent cellularitással és vascularizációval. A kórosan átépült csontalapállomány élénk basophil festődésű. Az emberi riboszomális RNS kimutatható volt, szemben a kanyaróvírus specifikus RT-PCR-al, amely negatív eredményt adott

restrikciós elemzés eredményeit agaróz gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá.

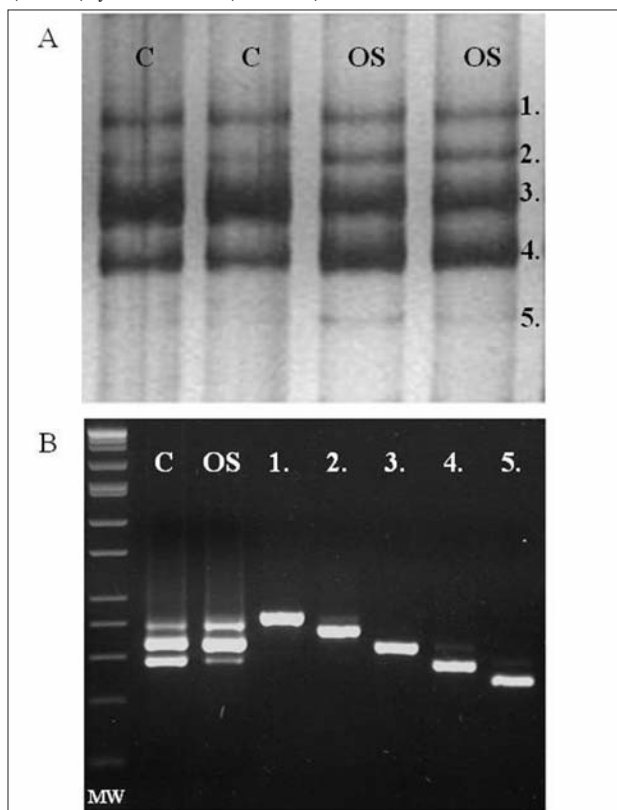
Eredmények

A stapedectomy során eltávolított, ankyloticus stapes talp mintákat kórszövettani- és molekuláris biológiai elemzésnek vetettük alá. Otosclerost 21 ankyloticus stapes talpszövettani elemzése során állapítottunk meg (2. ábra). Az otosclerosis gócok 16 esetben aktívnak, míg 5 esetben inaktívnak (kiegítettnek) bizonyultak (2. ábra). Hangsúlyozzuk, hogy a részlegesen eltávolított stapes talpakat kizártuk a tanulmányból, hiszen az ovális ablakban maradt elülső- illetve hátsó stapes talp részletek tartalmazhatták a valódi csontos fixációt okozó elváltozást. A nem-otosclerosis stapes talpak többségében (N=19), a

kórszövettani vizsgálat stapediovestibuláris kalkifikációt állapított meg, melyet eosinophil festődésű extracelluláris mátrix, csökkent cellularizáció és hypovascularizáció jellemezett (2. ábra).

Az emberi riboszomális RNS-t minden ankyloticus stapes talp mintában kimutattuk, megerősítve ezzel a kanyaróvírus- és a CD46 kimutatás molekuláris biológiai módszereinek validitását (2. ábra). A szövettani leletek szoros összefüggést mutattak a kanyaróvírus specifikus RT-PCR eredményével. A virális nukleoproteint (NP) kódoló RNS szekvenciákat kizárólag a szövettani vizsgálattal is megerősített otosclerosis stapes talpakban (N=21) mutattuk ki (2. ábra). A vírus negatív stapes talpak (N=30) szövettanilag nem-otosclerosis, degeneratív elváltozásokat mutattak, melyek az otosclerostól elméletileg különböző etiopathogenetikai folyamatok eredmé-

nyei lehetnek (2. ábra). Az otosclerosis stapes fixációt a stapes talpban egyértelműen felismerhető csontreszorpciós göcök jelezte. Az otosclerosis göcökben a szövettani aktivitástól függően, több-kevesebb vasculáris és pseudovasculáris elem, osteoclast, osteoblast és proliferációs aktivitást mutató endothelsejt volt felismerhető (2. ábra). A nem-otosclerosis stapes fixációkat szövettanilag annuláris kalcifikáció (N=19), globuláris fibrózis (N=7) és lymphoplasmocytar infiltrációval járó osteolysis (N=4) jellemezte (2. ábra).



3. ábra. A CD46 „splicing” variánsok komplementer DNS amplimerjeinek SDS polyacrylamid gélelektroforézissel történő elválasztása (SDS-PAGE).

A: A CD46 expressziós mintázata otosclerosis és nem-otosclerosis stapes talp mintákban (inverz SDS-PAGE fénykép UV fény expozícióval). Az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes mintákban ugyanazt az öt CD46 variánsot mutattuk ki, de jelentősen eltérő kifejezési szintekkel. A CD46 izoformák együttes expressziójának mintázata szoros összefüggést mutatott a kórszöveti leletekkel. A számok a CD46 mRNS specifikus RT-PCR során keletkező izoforma amplimereket jelölik. C: negatív kontroll, nem-otosclerosis stapes talp. OS: otosclerosis stapes talp.

B: Tisztított és elválasztott CD46 cDNS-ek (agaróz gél fénykép UV fény expozícióval). A számok a tisztított és újra elválasztott CD46 izoformák amplimerjeit jelölik, melyek a CD46 mRNS specifikus RT-PCR során keletkeztek. C: negatív kontroll, nem-otosclerosis stapes talp. OS: otosclerosis stapes talp. MW: molekulatömeg marker. 1: c variáns; 2: e variáns; 3: d variáns; 4: f variáns; 5: ismeretlen variáns

A kanyaróvírus-ellenes szérum IgG szintek statisztikailag szignifikáns módon különböztek az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes fixációk esetén. Az otosclerosis betegek szérumában mérhető, átlagolt kanyaróvírus-ellenes immunglobulin G szint szignifikánsan alacsonyabb volt (medián = 6,9 IU/ml), mint a vírusnegatív, nem-otosclerosis stapes fixációk esetén (medián = 142 IU/ml). Tizenhét beteg részesült dokumentált gyermekkori monovalens kanyaróvírus-ellenes védőoltásban. Érdekes módon közöttük 11 beteg szövettanilag megerősített, kanyaróvírus pozitív otosclerosisban szenvedett; ennek ellenére a kanyaróvírus-ellenes IgG szérum szint a negatív tartományba esett (medián = 6,1 IU/ml). Ez azt jelenti, hogy ezekben a betegekben sem a védőoltás, sem a perzisztáló kanyaróvírusfertőzés hatására nem alakult ki hagyományos értelemben vett IgG alapú szerokonverzió. A másik hat beteg esetében szövettanilag nem-otosclerosis stapes fixációt állapítottunk meg élénk kanyaróvírus-ellenes szeropozitivitással (IgG medián = 133 IU/ml).

Mind az otosclerosis, mind a nem-otosclerosis stapes talpakban ugyanaz az öt CD46 izoforma fejeződött ki, de az izoformák expressziós szintjeiben jelentős különbség mutatkozott (3. ábra). A CD46 izoformákat restrikciós elemzéssel és a hasított termékek molekulatömeg eloszlásával azonosítottuk (4. ábra). A c, d, e és az f variánsokat minden mintában azonosítottuk, azonban egy eddig ismeretlen, rövid CD46 „splicing” izoformát is kimutattunk (3., 4. ábra). Az alternatív „splicing” során keletkezett, ismeretlen CD46 izoformát egy igen rövid, és a 9. exont tartalmazó hypervariábilis régió jellemezte (4. ábra). Ezen izoforma restrikciós (emésztési ill. hasítási) mintázata teljesen megegyezett a jól ismert n izoformáéval, azonban a keletkezett hasítási termékek molekulatömege jelentősen különbözött (4. ábra, 2. táblázat). Az öt CD46 izoforma relatív (egymáshoz viszonyított) expressziós szintjeit denzitometria segítségével állapítottuk meg. A nem-otosclerosis stapes fixációkkal szemben az otosclerosis stapes fixációkat az f és az ismeretlen CD46 izoforma domináns expressziója jellemezte (3. ábra). Összefoglalva, az otosclerosis a CD46 variánsok egyedi ko-expressziója jellemezte a következő csökkenő expressziós szintekkel: f (4.), d (3.), e (2.), c (1.), és az ismeretlen (5.) variáns (3. ábra). A nem-otosclerosis stapes fixációk esetén a következő konzekvens mintázatot észleltük a csökkenő kifejeződés sorrendjében: d (3.), f (4.), c (1.), e (2.) és az ismeretlen (5.) „splicing” izoforma (3. ábra). Hangsúlyozzuk, hogy a nem-otosclerosis stapes fixációk esetén, az ismeretlen (5.) variáns még éppen kimutatható volt, de a többi variáns

sal összehasonlítva elhanyagolhatóan alacsony expressziós szintet mutatott (3. ábra).

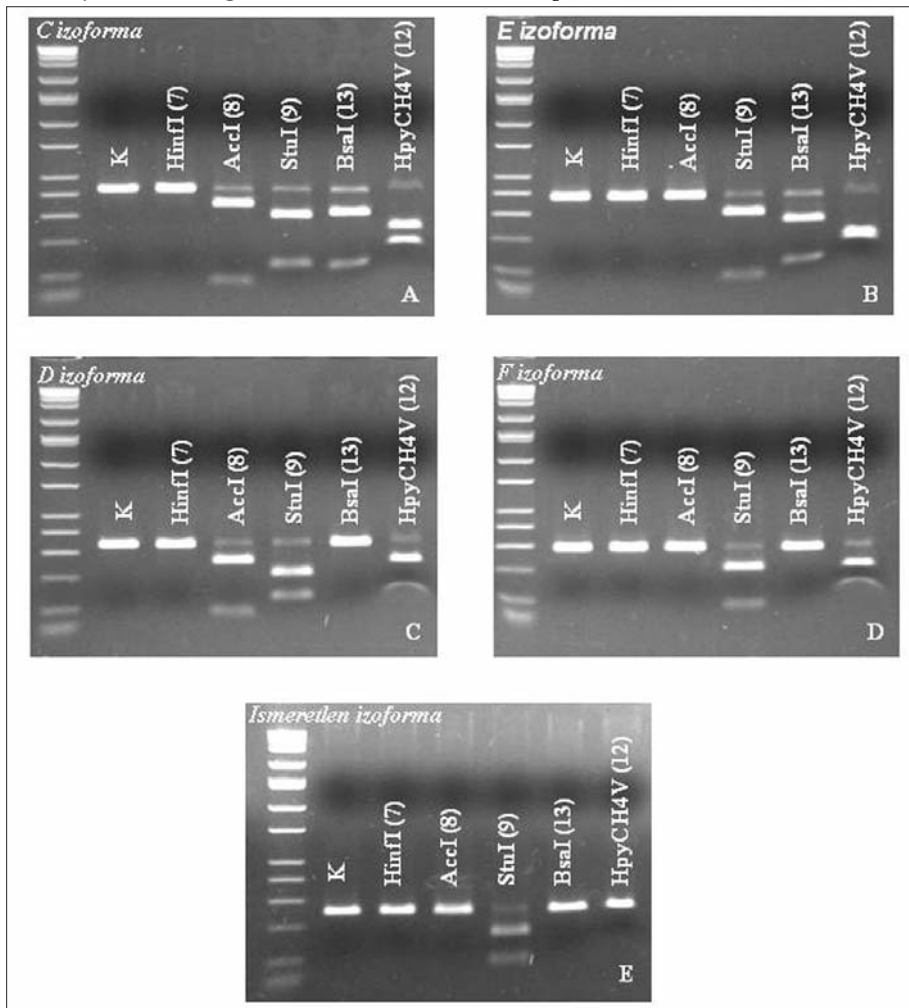
Megbeszélés

Kísérleteinkkel igazoltuk a kanyaróvírus eredetű RNS jelenlétét a szövettani vizsgálattal megerősített otosclerosis stapes mintákban. Ez az otosclerosisra jellemző vírus-asszociáció teljes mértékben független az otosclerosis csontátépülés kórszövettani aktivitásától. A szövettanilag nem-otosclerosis stapes mintákban a virális RNS kimutatása sikertelen volt. A kanyaróvírus negatív, nem otosclerosis stapes fi-

xációk szövettanilag leginkább degeneratív kórfolyamatok eredményei lehetnek.

Az otosclerosis egyik fő kóroki tényezője az emberi oticus capsulában zajló, krónikus perzisztáló kanyaróvírus replikáció lehet (4, 5). A kanyaróvírus eredetű antigének folyamatos kifejeződése a celluláris immunválasz állandó stimulációját eredményezi, ami az érintett csontszövetben megjelenő gyulladásos reakcióval és következményes sejtkárosodással jár (4, 5, 7, 8). Mindezek a folyamatok tehát másodlagosak, hiszen a defektív kanyaróvírus képtelen közvetlen szövetkárosító hatást kifejteni (4, 5, 7, 8). Azok az immunológiai ingerek, amelyek az antigének által

aktivált CD3 és CD46 molekulákon keresztül hatnak, alapvető szerepet játszanak a regulátor T-helper 1 (rTh1) sejtek differenciálódásában és aktiválódásában (23, 24). Ezek a szabályozó funkcióval rendelkező sejtek fontos szerepet töltenek be az autoreaktív, cytotoxicus CD8 pozitív T-sejtek eliminációjában (25). A regulátor T-sejt populáció inaktiválódása vagy elégtelen differenciálódása csökkentheti, illetve megszüntetheti a természetes saját szöveti toleranciát, amely különböző autoimmun betegségek kialakulásához vezet (25). Az ismeretlen rövid CD46 „splicing” variáns valószínűleg egy az újonnan felismert otosclerosisra kapcsolódott izoformák közül (18). Ezen otosclerosis specifikus CD46 variánsok jelenléte az emberi oticus capsula sejtjeinek felszínén, valószínűleg elégtelenné teszi a kanyaróvírus antigének által aktivált CD3-CD46 receptor-komplex működését a regulátor T-helper 1 sejtek differenciálódásában (24, 25). Ezen molekuláris szintű események eredményezhetik az oticus capsula ellen kialakuló másodlagos autoimmun reakciót, amely végső soron



4. ábra. A CD46 komplementer DNS amplimerjeinek restrikciós (hasítási) elemzése. Az öt elválasztott CD46 „splicing” variáns összehasonlító elemzését egy molekulatömeg marker segítségével végeztük el. Négy eddig ismert CD46 variánst sikerült azonosítanunk: c izoforma, e izoforma, d izoforma és végül az f izoforma. Egy közülük ismeretlen és beazonosíthatatlan „splicing” variáns volt, amely ugyanazt a restrikciós mintázatot mutatta, mint az n izoforma, azonban a molekulatömegük jelentősen különbözött. A HinfI, AccI, StuI, HpyCH4V és a BsaI a CD46 hypervariábilis régiójára specifikus hasítási hellyel rendelkező restrikciós endonukleázok. Az adott endonukleáz neve mögött lévő szám a hasítási helyet tartalmazó exon sorszámát jelöli a CD46 hypervariábilis régiójában. A: a c izoforma restrikciós mintázata. B: az e izoforma restrikciós mintázata. C: a d izoforma restrikciós mintázata. D: az f izoforma restrikciós mintázata. E: az ismeretlen és eddig azonosítatlan CD46 izoforma restrikciós mintázata. K: nem hasított kontroll amplimer. MW: molekulatömeg marker

következményes szenzorneurális halláscsökkenést okoz (10, 26–28).

A CD46 „splicing” variánsok restrikciós elemzése további információkkal szolgált az otosclerosis- és a nem-otosclerosis stapes fixációk kanyaróvírus receptor ko-expressziós mintázatát illetően. Az otosclerosis- és a nem-otosclerosis stapes fixációkat ugyanazon öt CD46 izoforma együttes expressziója jellemezte, azonban az expressziós mintázatok a kórszövettani lelettel összefüggő megjelenést mutattak. A stapes talp mintákban a *c*, *d*, *e* és *f* variánsokat valamint egy ismeretlen, az eddig leírt CD46 variánsoknál lényegesen rövidebb izoformát azonosítottunk. A nem-otosclerosis stapes fixációkkal szemben, otosclerosis esetén az *f* variáns és az ismeretlen variáns fokozott expresszióját tapasztaltuk. Az alternatív „splicing” következtében az *f* variáns mRNS-éből hiányzik a 13-as exon. Ez az exon kódolja a CD46 receptor cytoplasmaticus doménjének nagyobbik részét (19). Ez a domén felelős a receptor aktivációt követő intracelluláris foszforiláz-mediált jelátvitelért (19). A 13-as exon hiánya módosult illetve kóros intracelluláris jelátvitelt eredményezhet (19). Az intracelluláris szignáltranszdukciós folyamatok szövetspecifikus megváltozása felelős lehet a perzisztáló kanyaróvírus fertőzések kialakulásáért. Eredményeink azt sugallják, hogy az otosclerosis szervspecifikus kialakulása és az emberi oticus capsula Paramyxovírus receptor expressziós mintázata között nem elhanyagolható összefüggés áll fenn (18).

Összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy az oticus capsula részeként tanulmányozott stapes talpak a kórszövettani lelettől függő, egyedi CD46 receptor expressziós mintázatot mutatnak. Ez a speciális és szövetspecifikus CD46 kifejeződési mintázat lehet felelős a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés iránti fogékonyság kialakulásáért.

Köszönetnyilvánítás

Munkánk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA PD75371) és a Debreceni Egyetem Mecenatúra Pályázatának (DE OEC Mec 17/2008) anyagi támogatásával készült.

Irodalom

1. Sidding MA. Otosclerosis: a review of aetiology, management and outcomes. *Br J Hosp Med* **67**, 470-476, 2006.
2. Linthicum FH Jr. Histopathology of otosclerosis. *Otolaryngol Clin North Am* **26**, 335–352, 1993.
3. Wang PC, Merchant SN, McKenna MJ, Glynn RJ, Nadol JB Jr. Does otosclerosis occur only in the temporal bone? *Am J Otol*. **20**, 162–165, 1999.
4. Karosi T, Kónya J, Szabó LZ, Sziklai I. Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol*. **25**, 451-456, 2004.

5. Arnold W, Friedmann I. Otosclerosis – an inflammatory disease of the otic capsule of viral aetiology? *J Laryngol Otol*. **102**, 865-871, 1988.
6. Niedermeyer HP, Arnold W, Schuster M, Baumann C, Kramer J, Neubert WJ, Sedlmeier R. Persistent measles virus infection and otosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. **110**, 897-903, 2001.
7. Arnold W, Niedermeyer HP, Lehn N, Neubert W, Höfler H. Measles virus in otosclerosis and the specific immune response of the inner ear. *Acta Otolaryngol*. **116**, 705-709, 1996.
8. Niedermeyer HP, Arnold W. Otosclerosis: a measles virus associated inflammatory disease. *Acta Otolaryngol*. **115**, 300-303, 1995.
9. McKenna MJ, Mills BG. Ultrastructural and immunohistochemical evidence of measles virus in active otosclerosis. *Acta Otolaryngol*. **470**, 130–140, 1990.
10. Sziklai I. Human otosclerotic bone-derived peptide decreases the gain of the electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res*. **95**, 100-107, 1996.
11. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Seki F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis*. **59**, 1-5, 2006.
12. Cattaneo R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogen's magnet. *J Virol*. **78**, 4385-4388, 2004.
13. Karosi T, Jókay I, Kónya J, Petkó M, Szabó LZ, Sziklai I. Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch of Otorhinolaryngol*. **264**, 607-613, 2007.
14. Russel SM, Sparrow RL, McKenzie IF, Purcell DF. Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alternative splicing. *Eur J Immunol*. **6**, 1513-1518, 1996.
15. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends in Immunol*. **25**, 496-503, 2004.
16. Barilla-Labarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol*. **16**, 6298-6304, 2002.
17. Seya, T, Hirano A, Matsumoto M, Nomura M, Ueda S. Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int J Biochem Cell Biol*. **31**, 1255-1260, 1999.
18. Karosi T, Szalmás A, Csomor P, Kónya J, Petkó M, Sziklai I. Disease associated CD46 splicing variants and pathologic bone remodelling in otosclerosis. *Laryngoscope*. **118**, 1669-76, 2008.
19. Marie JC, Astier AL, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B. Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmatic domains in T cell-induced inflammation. *Nat Immunol*. **3**, 659-666, 2002.
20. Sallie R, Permar, Griffin DE, Levitt NL. Immune containment and consequences of measles virus infection in healthy and immunocompromised individuals. *Clin Vaccine Immunol*. **13**, 437-443, 2006.
21. Griffin DE, Ward BJ, Juaregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation during measles: beta 2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis*. **166**, 1170-1173, 1992.
22. Griffin, DE, Ward BJ, Jaregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation in measles. *N Eng J Med*. **320**, 1667-1672, 1989.

23. Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V. Measles virus induced immunosuppression: Targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med.* 1, 163-181, 2001.
24. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.* 421, 388-392, 2003.
25. Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 101, 455-458, 2000.
26. Helfgott SM, Moscicki RA, San Martin J, Lorenzo C, Kieval R, McKenna M, Nadol J, Trentham DE. Correlation between antibodies to type II collagen and treatment outcome in bilateral progressive sensorineural hearing loss. *Lancet.* 337, 387-389, 1991.
27. Karosi T, Szekanecz Z, Sziklai I. Otosclerosis: An autoimmune disease? *Autoimmun Rev.* – közlés alatt. 2009.
28. Répássy G, Czigler J, Lapis K. A stapes talp, szár és fejecsszár elváltozásainak összehasonlító vizsgálata otosclerosisban – adatok az otosclerosisos belsőfül-károsodás pathomechanizmusához. *Fül-orr-gégégyógy* 26, 201-209, 1980.

Zusammenfassung: Az otosclerosis az emberi oticus capsula elsődleges csontátépülési zavara, melynek létrejöttében szerepet játszhat az oticus capsulát érintő perzisztáló kanyaróvírus fertőzés. A kanyaróvírus emberi sejtreceptora a membrán kofaktor fehérje (MCP, CD46), amely 14 ismert „splicing” variánsal rendelkezik. Az oticus capsula és a stapes talp egyedi CD46 kifejeződési mintázata meghatározhatja a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés, illetve replikáció iránti fogékonyságot. Ötvenegy stapedectomy során eltávolított stapes talpat vizsgáltunk kórszövettani- és molekuláris biológiai módszerekkel párhuzamosan. A nukleinsavakat (mRNS, DNS, vRNS) kivontuk a stapes talpából. A kanyaróvírust nukleoprotein RNS specifikus RT-PCR-rel azonosítottuk. Az alternatív „splicing” során keletkező CD46 izoformákat RT-PCR segítségével sokszoroztattuk. A komplementer DNS (cDNS) amplimereket SDS polyacryl-amid gélelektroforézissel választottuk külön, majd a gélekből sorozatos tisztítással kivontuk. A tisztított cDNS mintákat CD46 specifikus hasítási helyekkel rendelkező restrikciós endonukleázokkal többszörösen hasítottuk. A kanyaróvírus eredetű RNS-t csak a szövettanilag megerősített otosclerosisos stapes talpban mutattuk ki; a kanyaróvírust nem tartalmazó stapes talp szövettanilag nem-otosclerosisos stapes ankylosisnak bizonyultak. A szövettani vizsgálat eredményétől függetlenül, minden mintát (N=51) öt CD46 variáns együttes expressziója jellemzett (c, d, e, f, és egy rövidebb ismeretlen izoforma). A szövettanilag otosclerosisosnak véleményezett mintákat (N=21) az f variáns és az ismeretlen rövid variáns kifejezetten emelkedett expressziója jellemezte. A fenti két CD46 izoforma fokozott kifejeződése és az oticus capsula egyedi CD46 expressziós mintázata megváltozott, illetve kóros intracelluláris jelátvitelt eredményezhet a kanyaróvírus receptorok szintjén. Ezek a változások a következményes immunológiai eltérésekkel együtt, magyarázhatják a perzisztáló kanyaróvírus fertőzés oticus capsulán belüli kialakulását.

KULCSSZAVAK: CD46, kanyaróvírus, otosclerosis, restrikciós elemzés, RT-PCR